

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : G01N 33/50, 33/58, 33/566		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/43779 (43) Date de publication internationale: 27 juillet 2000 (27.07.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00113 (22) Date de dépôt international: 19 janvier 2000 (19.01.00)		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 99/00588 20 janvier 1999 (20.01.99) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). UNIVERSITE MC GILL [CA/CA]; 3550 rue University, Montreal, Quebec H3A 2A7 (CA).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): VAUDRY, Hubert [FR/FR]; 36 route d'Epouville, F-76133 Maneglise (FR). CHARTREL, Nicolas [FR/FR]; 17, route de Quevillon, F-76113 St Pierre de Manneville (FR). BEAUDET, Alain [CA/CA]; 39 Promenade Surrey, Rue Mont-Royal, Quebec H3P 1B2 (CA). LENKEI, Zsolt [HU/FR]; 119-121, rue de Charenton, F-75012 Paris (FR). LLORENS-CORTES, Catherine [FR/FR]; 9, avenue de la Promenade, F-91440 Bures sur Yvette (FR).			
(74) Mandataire: MONCHENY, Michel; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).			
(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING THE LIGANDS OF A RECEPTOR CAPABLE OF BEING INTERNALIZED (54) Titre: IDENTIFICATION DES LIGANDS D'UN RECEPTEUR CAPABLE DE S'INTERNALISER			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns a method useful for detecting and/or identifying in a bank of peptides, pseudopeptides and non-peptide compounds, a biological extract or a purified fraction of a tissue extract, a ligand of a receptor of interest capable of being subjected to internalization induced by immobilising said ligand. The invention is characterised in that it comprises at least steps which consist in: expressing at the surface of a cell said receptor in a marked form; bringing in contact said cell and said bank in conditions suitable for cell internalization of said ligand-receptor complex; and displaying said internalization via the detection of the marker associated with said receptor.</p>			
(57) Abrégé			
<p>L'invention a pour objet un procédé utile pour détecter et/ou identifier dans une banque de composés peptidiques, pseudopeptidiques ou non-peptidiques, un extrait biologique ou une fraction purifiée d'un extrait de tissus, un ligand d'un récepteur d'intérêt et capable de subir une internalisation induite par la fixation dudit ligand caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes consistant à: exprimer à la surface d'une cellule ledit récepteur sous une forme marquée; mettre en présence ladite cellule avec ladite banque dans des conditions suffisantes pour permettre une internalisation cellulaire dudit complexe récepteur-ligand et visualiser cette internalisation via la détection du marqueur associé audit récepteur.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettone	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yugoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

IDENTIFICATION DES LIGANDS D'UN RECEPTEUR CAPABLE DE S'INTERNALISER

La présente invention a pour objet un procédé de criblage applicable à l'identification de ligands potentiels pour un récepteur capable de s'internaliser.

L'invention concerne plus particulièrement, mais non exclusivement les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G ainsi que ceux de la famille des récepteurs tyrosine kinase à un seul domaine transmembranaire.

A ce jour, environ 800 récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR) ont été clonés de différentes espèces eucaryotes. Chez l'homme, 240 GPCRs ont été isolés. Pour seulement 140 d'entre eux le ligand endogène est connu, pour les 100 autres restants qui constituent le pool des récepteurs orphelins, ils sont à identifier.

Parallèlement, plusieurs centaines de nouveaux médicaments agissant sur les GPCRs ont été enregistrés, au cours de ces vingt dernières années.

En conséquence, les récepteurs orphelins nouvellement clonés sont d'un grand intérêt pour la recherche pharmaceutique dans la mesure où ils sont susceptibles de représenter des cibles thérapeutiques potentielles. Toutefois, leur valorisation sur un plan thérapeutique implique au préalable d'isoler leur ligand endogène et, par là même, d'élucider leur fonction.

Sur l'ensemble de ces récepteurs orphelins couplés aux protéines G, seuls 5 ligands endogènes ont à ce jour été isolés, tous appartenant à des familles de peptides nouveaux : les orexines / hypocrétones, la nociceptine / orphanine, le PrRP, peptide libérant la prolactine, l'apeline et le peptide de type leucokinin (leucokinin-like).

Pour les identifier, les auteurs ont ciblé dans tous les cas des fractions de tissus purifiées sur différents tests.

5 Pour le choix des tests, ils ont mis à profit le fait que lorsque l'agoniste se fixe sur son récepteur, il y a formation d'un second messager qui va produire, suivant la voie de signalisation utilisée par le récepteur, différents produits et qui va dans tous les cas aboutir à un changement de pH intracellulaire.

Dans le cas de la nociceptine, les auteurs ont mesuré l'accumulation d'AMPc, résultant de la stimulation de l'adénylate cyclase.

Dans le cas des orexines, les auteurs ont mesuré l'accumulation de Ca²⁺ intracytoplasmique résultant de la stimulation de la phospholipase C.

10 Dans le cas du PrRP, les auteurs ont mesuré la formation d'acide arachidonique résultant de la stimulation de la phospholipase A2.

Dans le cas de l'apeline, ils ont mesuré les modifications de l'acidification du milieu extracellulaire à l'aide d'un "cytosenseur".

15 Toutefois, l'ensemble de ces voies d'identification n'est pas totalement satisfaisant pour les raisons suivantes :

La démarche d'identification consistant à évaluer la production de seconds messagers nécessite de connaître la voie de signalisation du récepteur. En présence d'un récepteur orphelin, n'ayant aucune idée de la voie mise en jeu, il s'avère nécessaire de tester l'ensemble des voies de signalisation connues avec l'espoir que le récepteur d'intérêt ne soit pas couplé à une voie encore inconnue. Ceci nécessite donc de disposer d'une quantité d'échantillon importante. Cette démarche implique également que le récepteur d'intérêt soit couplé à une cascade de seconds messagers dans les systèmes de transfection hétérologues dans lesquels ils sont exprimés, ce qui n'est pas nécessairement le cas.

Quant à l'approche consistant à mesurer l'acidification du milieu extracellulaire, suite à la production de protons par la cellule activée, elle se heurte au problème suivant : si l'on met en présence des banques de peptides ou des fractions purifiées d'extraits de tissus avec un récepteur orphelin exprimé à la surface d'une cellule, on mesure une modification de pH extracellulaire qui résulte de la stimulation non seulement du récepteur orphelin

mais aussi de tous les récepteurs endogènes présents. On ne peut donc pas délimiter facilement le ligand responsable de l'activation du récepteur orphelin.

La présente invention a précisément pour objet de proposer une 5 nouvelle méthode pour détecter et/ou identifier les ligands de récepteurs orphelins qui s'avère plus fiable que celles évoquées ci-dessus, réalisable sur des échantillons de faibles volumes et exploitable en présence d'autres récepteurs endogènes et d'un nombre important de ligands, peptidiques ou non peptidiques, pour ces récepteurs endogènes annexes.

10 La méthode développée dans le cadre de la présente invention met à profit les propriétés qu'ont les récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G, ou les récepteurs à tyrosine kinase, de s'internaliser dans les cellules qui les expriment sous l'action de ligands agonistes. L'internalisation est un phénomène assez universel qui 15 touche un grand nombre de récepteurs. Cette internalisation peut ainsi être visualisée en microscopie confocale, optique ou même électronique lorsque le ligand est marqué avec une molécule fluorescente ou un marqueur épitopique. Les complexes ligand-récepteurs suivent alors un cheminement intracellulaire 20 caractéristique, qui a déjà été bien étudié. Par exemple, cette technique de marquage fluorescent ou épitopique a déjà été préconisée pour suivre le trafic intracellulaire soit :

- d'un ligand marqué, complexé à son récepteur respectif, ledit récepteur subissant une internalisation induite par son activation,
- d'une protéine impliquée dans la transduction du signal, en 25 l'occurrence la protéine kinase C marquée,
- soit encore d'une protéine impliquée dans la désensibilisation d'un récepteur après l'activation de celui-ci, en l'occurrence la β -arestine 2 marquée.

Toutefois, l'option consistant à marquer soit un ligand soit une 30 protéine impliquée dans la transduction du signal ou encore dans la désensibilisation d'un récepteur après l'activation de celui-ci, comme la β -arestine 2 marquée n'est pas totalement fiable. Il peut en effet demeurer une ambiguïté sur l'identité du récepteur dont l'internalisation a été suivie. De plus

des données récentes suggèrent que des protéines différentes peuvent être impliquées dans les mécanismes d'internalisation et de désensibilisation de divers récepteurs. La β -arestine 2, en particulier, ne semble pas jouer un rôle universel.

5 Par exemple, lorsque l'on suit la mobilisation de la β -arestine couplée à l'EGFP, lors de la stimulation du récepteur orphelin par son ligand, il y a phosphorylation du récepteur qui peut alors fixer la β -arestine2-GFP mobilisée du cytoplasme à la membrane. Il y a ensuite séquestration du récepteur et internalisation. Or, dans le cas de la recherche d'un ligand 10 endogène d'un récepteur orphelin surexprimé à la surface de cellules eucaryotes, la mise en contact avec une banque de peptides ou de fractions purifiées de tissu résulte en l'activation non seulement du récepteur orphelin mais aussi de tous les récepteurs endogènes couplés aux protéines G. Il en résulte donc une mobilisation de la β -arestine 2-GFP non seulement par le 15 récepteur orphelin mais aussi par les récepteurs endogènes. Ceci ne permet donc pas d'identifier le ligand responsable de l'activation du récepteur orphelin.

De même, dans le cas d'une banque de peptides ou de fractions de tissus purifiées contenant le ligand endogène recherché, si tous les peptides 20 sont marqués de façon homogène on ne peut pas identifier celui que l'on recherche.

Le procédé de criblage revendiqué a précisément pour avantage de lever cette indétermination.

Plus précisément, la présente invention concerne un procédé utile 25 pour détecter et/ou identifier dans une banque de composés peptidiques, pseudopeptidiques ou non-peptidiques, un extrait biologique et/ou une fraction purifiée d'un extrait de tissus, un ligand d'un récepteur d'intérêt et capable de subir une internalisation induite par la fixation dudit ligand, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes consistant à :

30 - exprimer ledit récepteur sous une forme marquée à la surface d'une cellule,

- mettre en présence ladite cellule avec ladite banque, l'extrait biologique et/ou une fraction purifiée d'un extrait de tissus et contenant au

moins un composé peptidique, pseudopeptidique ou non peptidique susceptible d'être un ligand dudit récepteur, dans des conditions suffisantes pour permettre une internalisation cellulaire dudit complexe récepteur-ligand et

- visualiser cette internalisation via la détection du marqueur lié
5 audit récepteur.

La présente invention implique donc le marquage du récepteur orphelin pour lequel notamment sont recherchés des agonistes potentiels.

Le fait de marquer en soit le récepteur orphelin est nettement
10 avantageux au regard des techniques de détection évoquées ci-dessus. En effet, cette approche offre la possibilité de visualiser directement la cible étudiée. Lors de la mise en contact du récepteur avec le ligand endogène, c'est le complexe ligand-récepteur-marqueur qui est internalisé. Il n'y a pas d'ambiguïté sur l'identité du récepteur internalisé.

15 De plus, dans le procédé revendiqué, la cellule surexprime constitutivement le récepteur marqué. Le marquage est intracellulaire, sur la queue cytoplasmique du récepteur et a donc pour avantage de ne pas gêner la fixation du ligand.

En ce qui concerne les marqueurs convenant à l'invention, il peut
20 s'agir soit d'une protéine autofluorescente soit d'un marqueur épitopique susceptible d'être détecté par immunohistochimie.

Les protéines fluorescentes pouvant être mises en œuvre dans le procédé revendiqué appartiennent de préférence à la famille de la protéine fluorescente sauvage GFP et ses mutants (Ex : EGFP, EBFP et EYFP). Wang
25 S. & Halzelrigg T. (1994) Nature, 369:400-403 ; Yang TT et al. (1996) Nucleic Acid Res, 24: 4592-4593 ; Heim R & Tsien RY (1994) Curr. Biol., 6:1, 178-182; Ormö M et al., (1996) Science, 273:1392-1395.

A titre illustratif des marqueurs non fluorescents susceptibles d'être également mis en œuvre selon l'invention, on peut tout particulièrement
30 citer l'hémagglutinine, la polyhistidine, les protéines myc et flag et les épitopes viraux. Il existe déjà pour tous ces composés fortement immunogènes des anticorps sélectifs hautement affins dans le commerce (ex : anticorps monoclonaux antimyc, Clontech; anticorps antihémagglutinine influenza,

Boehringer; anticorps anti-virus de la somatostatine vésiculaire, Clontech; anticorps anti-polyhistidine, In Vitrogen). Leur détection implique une reconnaissance du groupement antigénique par l'un de ces anticorps (dits primaires), suivi d'une visualisation de l'anticorps primaire par un anticorps 5 secondaire provenant d'une autre espèce et marqué soit par un fluorophore, soit par la peroxydase du raifort que l'on fera consécutivement réagir avec un substrat approprié.

Ce type de marquage est particulièrement intéressant dans la mesure où il permet une sensibilité de mesure élevée qui se traduit par la 10 détection d'une concentration de ligand de l'ordre de 10^{-8} M c'est-à-dire 100 fmoles dans 10 μ l. L'internalisation du complexe est visible en microscopie confocale voire même optique lorsque le récepteur est fortement exprimé et si le ligand est en concentration suffisante (minimum 10^{-8} M).

Cette internalisation est de préférence détectée par microscopie 15 confocale et/ou optique.

Enfin, avantageusement, les autres récepteurs endogènes, non marqués, présents à la surface des cellules hôtes, même s'ils sont également internalisés, ne sont pas visibles et n'interfèrent pas au niveau de la mesure. Il 20 n'est donc noté aucun bruit de fond ce qui est particulièrement intéressant au regard de la grande sensibilité de la méthode de mesure.

De manière générale, le procédé revendiqué s'avère posséder une sensibilité suffisante pour permettre la visualisation d'une internalisation d'un conjugué récepteur-ligand au sein de la fraction testée nonobstant la présence d'autres récepteurs endogènes et d'un grand nombre de ligands, 25 peptidiques ou non peptidiques pour ces récepteurs endogènes annexes.

Avantageusement, le procédé de criblage revendiqué s'avère adapté à l'étude de tout récepteur à condition que celui-ci possède la capacité de s'internaliser.

30 Selon un mode privilégié de l'invention, le récepteur d'intérêt est couplé à une protéine G.

Le procédé revendiqué est particulièrement intéressant pour caractériser des ligands de récepteurs appartenant à la famille des récepteurs

à 7 domaines transmembranaires couplés à la protéine G, les GPCRs, à la famille des récepteurs tyrosine kinase à un seul domaine transmembranaire ou à la famille des récepteurs des cytokines.

Dans le cas des GPCRs, l'étiquetage des récepteurs en C-terminal présente les avantages suivants :

- la maturation post-traductionnelle du récepteur n'est pas modifiée,
- la liaison des agonistes et des antagonistes ainsi que la signalisation intracellulaire sont les mêmes qu'avec le récepteur natif,
- l'internalisation des complexes ligand-récepteurs n'est pas modifiée et
- la méthode de détection de l'expression est rapide et peut être effectuée sur des cellules vivantes non fixées.

Le récepteur à étudier est couplé à un marqueur puis exprimé à la surface d'une cellule-hôte. En ce qui concerne ces deux opérations, à savoir le marquage et l'expression dudit récepteur au niveau d'une cellule-hôte, elles relèvent bien entendu toutes deux des compétences de l'homme de l'art.

Généralement, on opère de la manière suivante :

La séquence de la partie codante du récepteur d'intérêt est insérée en phase, dans un vecteur d'expression, en amont ou en aval de la séquence codante de la protéine fluorescente (GFP, EGFP, EBFP, EYFP) ou d'un marqueur épitopique. Ces vecteurs d'expression (de type pGFP-N1 ou pGFP-C1, N1 ou C1 indiquent la position du récepteur par rapport à la protéine soit en N-terminal, soit en C-terminal) contiennent déjà la séquence de ces marqueurs. Les cellules sont transférées par une méthode classique (tels que la méthode des liposomes, phosphate de calcium), puis sélectionnées pour leur résistance à un antibiotique. Dans le cas des protéines de la famille GFP, il est possible d'effectuer un tri des cellules exprimant le récepteur couplé à la protéine fluorescente par cytométrie de flux.

En ce qui concerne les cellules transformées il s'agit de cellules eucaryotes comme par exemple les cellules épithéliales de reins de singe : COS-7 ; d'ovaires de hamster : CHO ; et les cellules humaines embryonnaires de rein : HEK 293).

5 Dans une variante du procédé revendiqué, on peut envisager d'exprimer à la surface d'une cellule, deux ou plusieurs récepteurs distincts marqués respectivement par des marqueurs différents. Les deux récepteurs sont bien entendu capables de s'internaliser. Cette option offre ainsi la possibilité de cibler sur un même échantillon et simultanément des ligands potentiels pour plusieurs récepteurs.

10 Conformément au procédé revendiqué, les cellules hôtes sont mises en présence d'un ligand potentiel. Pour ce faire, on met donc en contact lesdites cellules avec soit une banque de composés peptidiques, pseudo-peptidiques ou non-peptidiques, un extrait biologique ou encore des fractions purifiées d'un extrait de tissus.

15 Cette mise en contact est effectuée dans des conditions suffisantes pour permettre l'internalisation cellulaire du ou des complexes récepteur-marqueur-ligand. Ces conditions suffisantes sont bien entendu appréciées par l'homme du métier, en termes de température, de durée et de concentration. Il peut également être nécessaire de procéder à des expériences répétées.

20 En règle générale, l'internalisation de complexes ligand-récepteur dans les cellules des mammifères est optimale à 37°C. La demi-vie moyenne du processus d'internalisation (temps requis pour que 50 % des récepteurs de surface occupés soient internalisés) est de l'ordre de 10 minutes. Ainsi, des expositions au ligand de 20 à 40 minutes sont habituellement optimales pour le repérage des récepteurs internalisés, les concentrations de ligand optimales sont de l'ordre de 10 à 20 fois l'affinité du ligand pour son récepteur (Kd).

25 On suit par microscopie confocale ou dans le cas d'une forte expression de ce récepteur marqué, par microscopie optique, l'internalisation du complexe ligand-récepteur qui se concrétise par le déplacement du marquage (fluorescent ou immunohistochimique) de la membrane de la cellule (dont l'intensité de marquage diminue) vers l'intérieur de celle-ci sous forme de vésicules.

30 Dans le cas d'un récepteur marqué avec une étiquette fluorescente, la visualisation s'effectue directement en observant le déplacement de la fluorescence.

Dans le cas où le récepteur est marqué avec un antigène non-fluorescent, l'internalisation est visualisée en microscopie confocale après fixation des cellules et détection des épitopes antigéniques par des anticorps secondaires couplés à un fluorophore. Alternativement, les épitopes antigéniques peuvent être révélés par une réaction enzymatique, ou à l'aide d'un anticorps radioactif qui se concrétise dans les deux cas par l'accumulation de dépôts opaques visibles aussi bien en microscopie photonique qu'électronique.

10 Comme évoqué précédemment, l'internalisation peut être visualisée sur une dizaine de cellules et pour un volume d'incubation très faible à savoir de l'ordre du μ l. Ces deux qualités sont particulièrement précieuses lorsque l'on ne dispose que d'une très faible quantité d'échantillon.

15 En conséquence, le procédé revendiqué s'avère tout particulièrement avantageux pour détecter et/ou identifier le ou les ligands endogènes d'un récepteur orphelin ou encore identifier de nouveaux agonistes ou antagonistes pour un récepteur connu, c'est-à-dire dont on connaît le ligand endogène.

20 Etant basé sur l'observation directe d'un phénomène biologique qui touche la plupart des récepteurs GPCR ou tyrosine kinase, à savoir l'internalisation, cette méthode s'avère particulièrement utile pour la recherche des ligands des récepteurs orphelins et plus particulièrement des récepteurs des peptides, en utilisant des préparations biologiques telles que des extraits de tissu.

25 On peut également envisager d'utiliser le procédé revendiqué avec un récepteur marqué, déjà identifié et caractérisé, comme un "biosenseur", qui permettrait de détecter dans un liquide biologique la présence même à l'état de traces d'une substance toxique ou non capable de 30 se lier sur ce récepteur.

La présente invention s'étend également à tout ligand d'un récepteur d'intérêt, identifié à l'aide du procédé revendiqué.

Les exemples et figures soumis ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de la présente invention.

FIGURES

5

Figures 1 :

figure 1a : Visualisation par microscopie confocale du récepteur de la neurotensine de type 1 couplé à la protéine fluorescente EGFP (NTR1-EGFP) à la surface de cellules CHO, incubées avec du tampon seul ou avec une concentration faible (1 nM) de neurotensine de rat ou de grenouille 10 n'induisant pas d'internalisation.

figure 1b : Visualisation de l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP caractérisée par la formation de nombreuses vésicules fluorescentes cytoplasmique de 0,6 μ m de diamètre à l'intérieur de cellules CHO incubées avec des concentrations de neurotensine de 10 et 100 nM.

15

Figures 2 : Visualisation de l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP avec ou sans lavage acide, en présence de : 10 nM de neurotensine (figure 2a) ou d'une fraction purifiée d'extrait de cerveaux de grenouille (figure 2b). Les conditions sont les mêmes qu'en figure 1, et comprennent en outre un lavage acide du ligand endogène encore lié à la surface des cellules à la fin de 20 la période de charge.

Figure 3 : Internalisation du récepteur NTR1-EGFP en présence de 10 fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille.

Figure 4 : Dosage radioimmunologique des fractions prépurifiées 25 d'un extrait de cerveaux de grenouille en utilisant un anticorps dirigé contre la région conservée de la neurotensine.

Matériels et méthodes*1) Construction du récepteur NTR1-EGFP*

5 La séquence codante entière du récepteur NT1 (K. Tanaka, M. Masu and S. Nakanishi (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4: 847-54) a été amplifiée par PCR en utilisant deux amores dirigées contre les extrémités 5' et 3' de la séquence codante de cet ADNc et contenant également des sites de restriction HindIII ou
10 BamH1 5'-CTT AAG CTT ATG CAC CTC AAC AGC TCC GTG-3' (SEQ ID N°1) et 5'-TTT GGA TCC GCG TAC AGG GTC TCC CGG GT-3' (SEQ ID N°2). Après digestion par les enzymes HindIII et BamH1 et purification, la séquence amplifiée a été insérée dans le vecteur d'expression pEGFP-N1 (Clontech) au niveau des sites HindIII et BamH1. La construction a été vérifiée sur un
15 séquenceur automatique AbiPrism 377 (Perkin-Elmer) en utilisant des ddNTP fluorescents.

2) Transfection stable dans les cellules CHO

Les cellules CHO-K1 (American Type Culture Collection : ATCC) ont été cultivées en atmosphère humide à CO₂ 5%, dans du milieu F12 supplémenté avec 7,5% de serum de veau fœtal, 1mM de glutamine, 100 unités/ml de pénicilline et 100 unités/ml de streptomycine (Boehringer Mannheim). Pour établir la lignée stable exprimant ce récepteur, les cellules CHO-K1 (environ 2,6x10⁶ cellules) ont été transfectées avec 8 µg de plasmide 20 en utilisant des liposomes cationiques (Dosper, Boehringer). Les cellules transfectées sont sélectionnées pour leur résistance à la génétidine. Les clones obtenus ont été triés en utilisant la cytométrie en flux qui prend en compte l'intensité de la fluorescence de chaque cellule. Une deuxième sélection a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence, en observant le niveau de 25 l'expression du récepteur NTR1-EGFP fluorescent, localisée à la surface membranaire des cellules de chacun des clones.

3) *Prépurification de l'extrait de cerveaux de grenouille*

– Collection des tissus

5 2541 cerveaux de grenouille verte mâle (espèce *Rana ridibunda*), correspondant à un poids de tissu frais de 215 g, ont été collectés au laboratoire sur des animaux fraîchement sacrifiés. Les cerveaux ont été congelés sur de la carboglace immédiatement après avoir été prélevés et conservés à -80°C.

10 – Extraction des tissus

Les cerveaux ont été plongés pendant 15 min dans l'acide acétique bouillant 0,5 M (2 litres), puis homogénéisés au mixeur. L'homogénat a été centrifugé à 4000 x g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a ensuite été préfiltré sur un assemblage de 10 colonnes de Sep-Pak C18 (Waters 15 Associates, Milford, MA) montées en série à un débit de 2 ml/min. Le matériel fixé sur les colonnes de Sep-Pak a été élué avec 20 ml d'une solution d'acétonitrile à 70%. Cette opération a été répétée 2 fois.

20 – Purification de l'extrait de cerveaux de grenouille par HPLC semi-préparative

Le matériel élué des colonnes de Sep-Pak a été partiellement évaporé afin d'éliminer l'acétonitrile, puis centrifugé à 13000 x g pendant 5 min. Le surnageant a été prélevé et divisé en 2. Chacun des 2 pools a ensuite été injecté sur une colonne semi-préparative Vydac C18 218TP1010 (1 x 25 cm) 25 (The Separations Group, Hesperia, CA) équilibrée avec une solution d'eau/acide trifluoroacétique (99,9:0,1; vol:vol) à un débit de 2 ml/min. Le matériel peptidique fixé à la matrice a été élué en utilisant un gradient d'acétonitrile s'élevant de 14 à 42% en 40 min à un débit de 2 ml/min, puis montant de 42 à 56 % pendant 60 min à un débit de 1 ml/min. L'éluat a été 30 collecté par fraction de 1 min et l'absorbance mesurée à 215 et 280 nm. Les fractions d'élution ont été conservées à -20°C. Avant les expériences

d'internalisation, chacune des fractions a été diluée avec de l'eau, partiellement évaporée afin d'éliminer l'acétonitrile, et complétée à un volume final de 50 µl.

4) Internalisation

5 Les cellules sont distribuées (50 % de confluence, 20 000 cellules par puit) puis cultivées pour la nuit sur des lames multi-puits (LabTek, Nunc) prétraitées avec de la polyallylamine (0,1 mg/ml, Aldrich). Sur ces lames, le volume des incubations (sauf pour la période de charge) et des lavages est de 250 µl par puits. 90 min avant le début de l'expérience, le milieu des cellules 10 est changé pour un milieu supplémenté avec de la cycloheximide (70 µM, Sigma). Les cellules sont ensuite préincubées pendant 15 min sur la glace dans du tampon Earle's froid (pH 7,4, contenant 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 3,6 mM MgCl₂, 0,1 % albumine sérique bovine, 0,01 % glucose et 0,8 mM 1,10-phénanthroline). Puis les cellules sont incubées pendant 15 30 min avec le ligand dilué dans 50 µl du tampon Earle's à 4°C (période de charge). A ce stade, un lot de cellules est soumis à un lavage acide hypertonique (0,2 M d'acide acétique et 0,5 mM de NaCl dans le tampon Earle's, pH 4 pendant 2 min à 4°C) afin de dissocier le ligand de ses récepteurs 20 de surface. L'internalisation est provoquée par remplacement du milieu par du tampon Earle's à 37°C et incubation des lames à 37°C pendant 20 à 30 min (période de chasse). A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées avec du tampon Earle's froid, fixées avec du paraformaldéhyde 4 % dissout dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4, rincées de nouveau dans du tampon Earle's froid puis montées en utilisant du Vectashield (Vector).

25

5) Microscopie confocale

Les cellules sont examinées avec un microscope confocal Leica TCS NT configuré avec un microscope inversé (Leica DM IRBE) équipé avec un laser argon/krypton avec des filtres d'excitation et d'émission 30 respectivement de 488 et 530-600 nm. Des images de 1024-1024 pixels de cellules individuelles sont obtenues en utilisant un objectif 63x à immersion à huile.

6) *Dosage radioimmunologique de la neurotensine sur des fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille*

Un volume de 5 µl de chaque fraction collectée en sortie d'HPLC semi-préparative est soumis à un dosage radioimmunologique de la neurotensine. Le dosage de la neurotensine a été effectué à l'aide d'un anticorps dirigé contre le fragment C-terminal de la neurotensine de porc (Marcos et al., Peptides 1996, 17: 139-146).

L'anticorps est utilisé à une dilution finale de 1:50 000, et la sensibilité du dosage est de 10 pg. Le dosage radioimmunologique est effectué à 4°C dans un tampon véronal 0,02 M (pH 8,6) contenant 4% d'albumine sérique bovine et 7000 cpm de (3-[125I] iodotyrosyl) neurotensine (Amersham, Buckinghamshire, UK). Les échantillons et l'anticorps ont été incubés à 4°C pendant 48 h. La séparation de la fraction de traceur liée à l'anticorps a été réalisée par précipitation en ajoutant à chaque échantillon une solution de γ -globulines (1 % dans du tampon véronal 0,02 M) et une solution de polyéthylène glycol (20 % dans un tampon véronal 0,02 M contenant 0,1 % d'albumine sérique bovine et 0,1 % de triton X-100). Après une incubation de 20 min à température ambiante, les échantillons sont centrifugés (3 000 x g, 30 min) et les culots comptés dans un compteur gamma.

20

EXEMPLE 1 : Internalisation du récepteur NTR1-EGFP en présence de neurotensine de grenouille ou de rat

1) *Caractérisation du récepteur NTR1-EGFP*

25 Le récepteur NTR1-EGFP est exprimé de façon stable dans la lignée cellulaire CHO et ses propriétés de liaison et de transmission du signal intracellulaire ont été déterminées. L'affinité de la neurotensine s'est révélée du même ordre (0,3 nM) pour le récepteur NTR1-EGFP et le récepteur NT1 sauvage. De la même façon, le récepteur marqué conduit à la production 30 d'inositols phosphates avec une EC50 (1 nM) identique à celle obtenue pour le récepteur NT1 sauvage (résultats non présentés).

2) *Internalisation du récepteur NTR1-EGFP en présence de neurotensine de grenouille ou de rat*

Les cellules incubées avec du tampon seul ou avec des concentrations faibles (concentrations inférieures à 1 nM) de neurotensine de 5 rat ou de grenouille présentent une fluorescence marquée du récepteur NTR1-EGFP localisée à la membrane des cellules (Fig. 1a).

L'incubation des cellules CHO-NTR1-EGFP avec des 10 concentrations croissantes de neurotensine (gamme commençant à 10 nM) entraîne une internalisation des récepteurs NTR1-EGFP, indiquée par une 15 diminution du marquage fluorescent membranaire et par la formation de nombreuses vésicules fluorescentes intracytoplasmiques de 0,6 µm de diamètre (Fig. 1b). Ce type de marquage n'est pas détecté lorsque le ligand est préalablement dissocié des récepteurs de surface suite à un lavage acide effectué à la fin de la période de charge (Fig. 2a). Ces résultats indiquent que 15 l'internalisation observée résulte de la fixation de la neurotensine sur les récepteurs membranaires pendant la période de charge.

EXEMPLE 2 : Internalisation du récepteur NTR1-EGFP en présence de fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille

20 Dans une première série d'expériences, 0,5 µl de chacune des 120 fractions d'élution d'un extrait de cerveaux de grenouille (prépurifié sur une colonne semi-préparative) ont été poolées par 10, donnant naissance à 12 pools de 10 fractions, chacun complété à 50 µl avec du tampon d'Earle's. Seul 25 le pool 2 contenant les fractions 11 à 20 entraîne l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP.

30 Dans une seconde série d'expériences, les fractions du pool 2, c'est à dire les fractions 11 à 20 (0,5 µl de volume de fraction originale dilué à 50 µl avec du tampon d'Earle's) ont été testées individuellement. Seules les 35 fractions 15,16,17,18 entraînent l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP (Fig. 3). Cette internalisation n'est pas détectée si les cellules sont soumises à un lavage acide à la fin de la période de charge (Fig. 2b) indiquant que

l'internalisation observée est le résultat de la fixation d'un ligand spécifique sur les récepteurs NTR1-EGFP pendant la période de charge.

5 EXEMPLE 3 : Dosage radioimmunologique de la neurotensine sur les fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille

Le dosage radioimmunologique des fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille utilisant un anticorps dirigé contre la région conservée de la neurotensine montre que le matériel immunoréactif est 10 exclusivement contenu dans les fractions 15,16,17,18 (Fig. 4). La quantité totale apparente de neurotensine mesurée dans les fractions d'élution de l'HPLC semi-préparative est de 894 ng dans 16 ml, ce qui correspond à une valeur de 352 pg de peptide par cerveau de grenouille. Par conséquent, le matériel provoquant l'internalisation du récepteur NTR1-EGFP, contenu dans 15 les fractions 15,16,17,18 correspond à la neurotensine endogène du cerveau de grenouille.

En conclusion, le procédé d'internalisation décrit ci-dessus est un moyen direct, simple, spécifique et fiable, permettant de détecter à partir de l'observation d'une seule cellule une quantité de neurotensine aussi faible que 20 500 fmoles dans 50 µl. Il apparaît que cette mesure est réalisable aussi bien sur une solution pure de neurotensine que sur une fraction d'extrait de tissu contenant non seulement la neurotensine mais aussi un grand nombre d'autres neuropeptides (le nombre minimum estimé par fraction étant de 50 peptides), avec une sensibilité similaire puisque l'on arrive à détecter, d'après le dosage 25 RIA, environ 250 fmoles.

REVENDICATIONS

1. Procédé utile pour détecter et/ou identifier dans une banque de composés peptidiques, pseudopeptidiques ou non-peptidiques, un extrait 5 biologique ou une fraction purifiée d'un extrait de tissus, un ligand d'un récepteur d'intérêt et capable de subir une internalisation induite par la fixation dudit ligand caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes consistant à :
 - exprimer à la surface d'une cellule ledit récepteur sous une forme marquée,
 - mettre en présence ladite cellule avec ladite banque, l'extrait biologique et/ou une fraction purifiée d'un extrait de tissus et contenant au moins un composé peptidique, pseudopeptidique ou non peptidique susceptible d'être un ligand dudit récepteur, dans des conditions suffisantes pour permettre une internalisation cellulaire dudit complexe récepteur-ligand et
 - visualiser cette internalisation via la détection du marqueur associé audit récepteur.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il permet la détection d'une concentration en ligand de l'ordre de $10^{-8}M$.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le 20 récepteur exprimé est un récepteur orphelin.
4. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le récepteur exprimé est un récepteur dont on connaît le ligand endogène.
5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le récepteur est marqué par une protéine 25 autofluorescente.
6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la protéine fluorescente est une protéine de la famille de la protéine fluorescente sauvage GFP ou un de ses mutants.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce 30 que la protéine fluorescente est choisie parmi les protéines EGFP, EBFP et EYFP.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le récepteur est marqué à l'aide d'un marqueur épitopique susceptible d'être détecté par immunohistochimie.

5 9 Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que le marqueur épitopique est choisi parmi l'hémagglutinine, la polyhistidine, les protéines myc et flag et les épitopes viraux.

10 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'internalisation est détectée par microscopie optique et/ou confocale.

11. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le récepteur marqué appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, les GPCRs, à la famille des récepteurs tyrosine kinase à un seul domaine transmembranaire ou à la famille des récepteurs des cytokines.

15 12. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on exprime à la surface d'une cellule, deux ou plusieurs récepteurs distincts marqués respectivement par des marqueurs différents.

13. Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications précédentes pour détecter et/ou identifier le ou les ligands endogènes d'un récepteur orphelin.

20 14. Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 13 pour identifier de nouveaux agonistes ou antagonistes pour un récepteur dont on connaît le ligand endogène.

15. Ligand d'un récepteur d'intérêt, identifié par le procédé selon l'une des revendications 1 à 12.

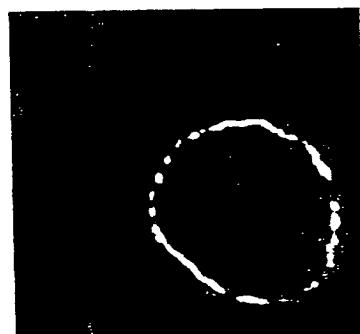
1/4

Concentration en neurotensineFIG. 1A

1 nM



0 nM

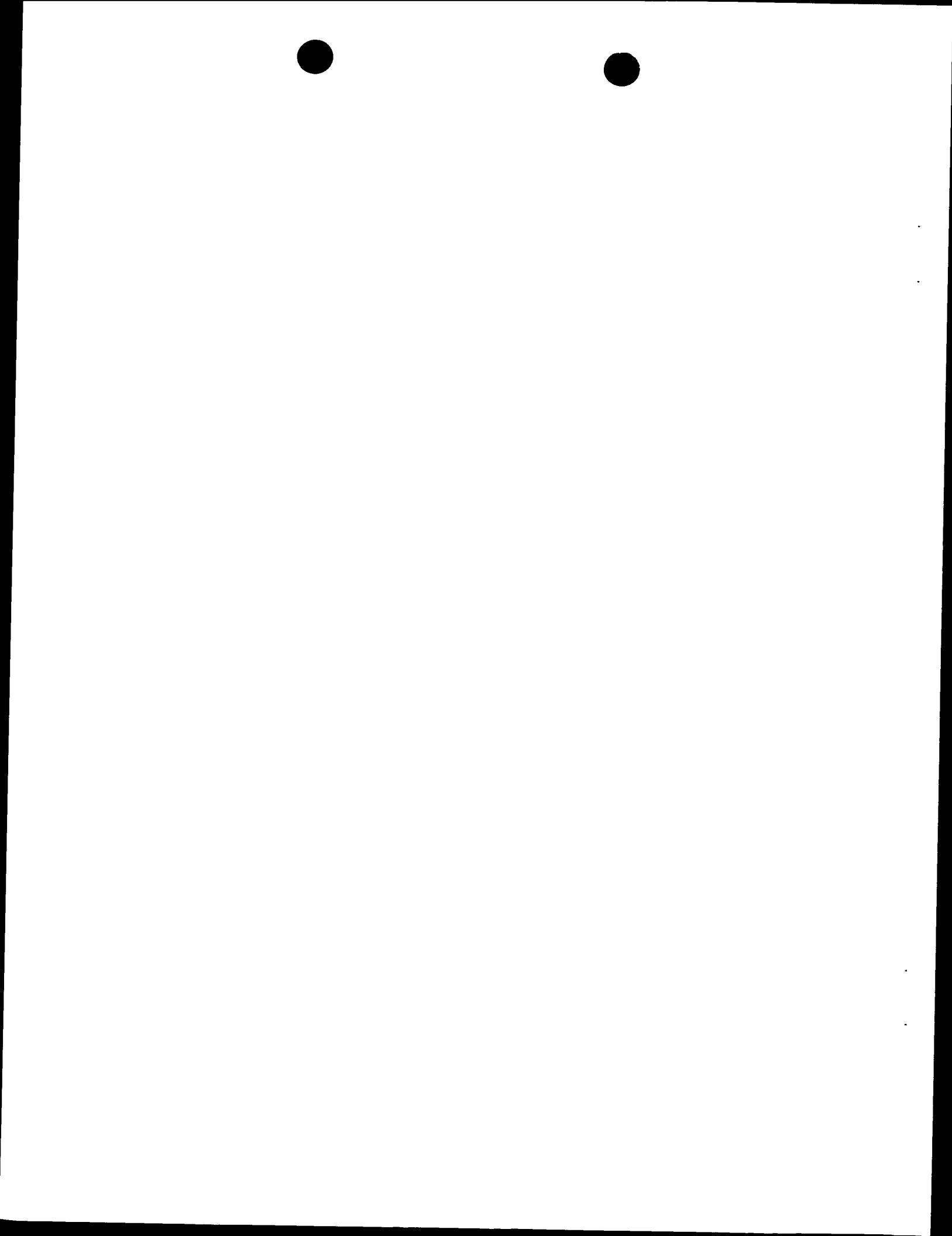


100 nM

FIG. 1B

10 nM

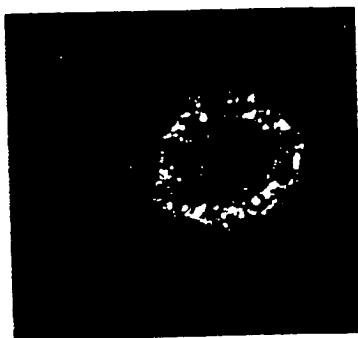




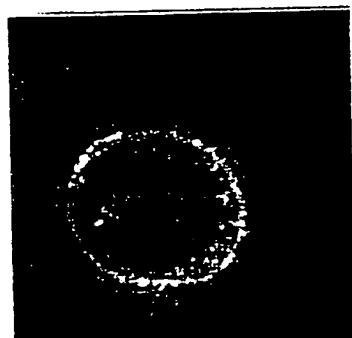
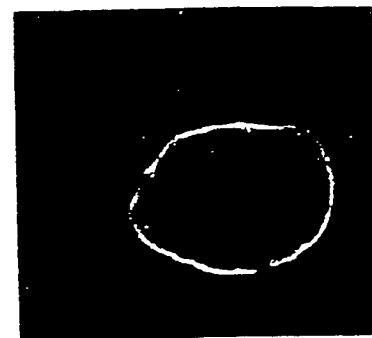
2/4

FIG.2A

Neurotensine 10 nM

Neurotensine 10 nM
+ lavage acide**FIG.2B**

Fraction 17

Fraction 17
+ lavage acide



3/4

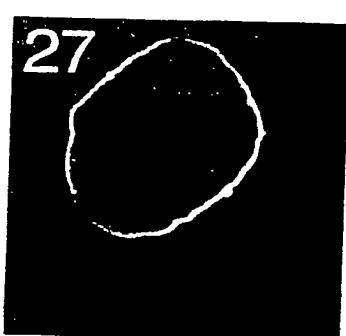
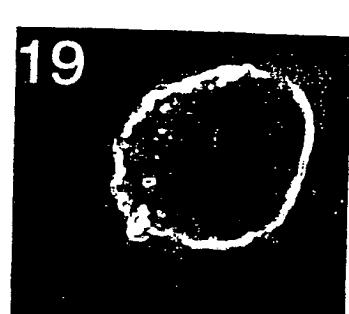
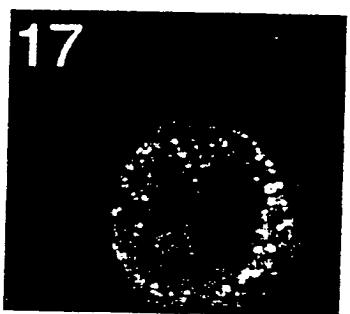
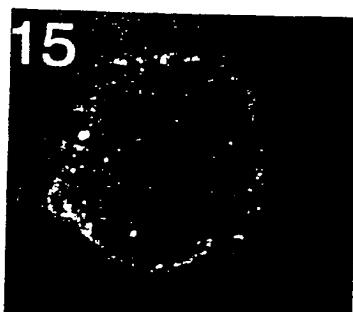
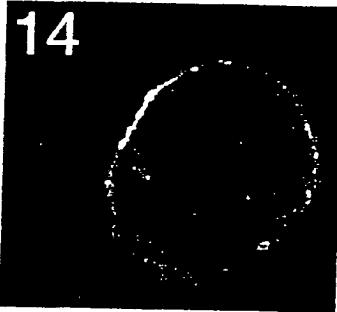
Fractions

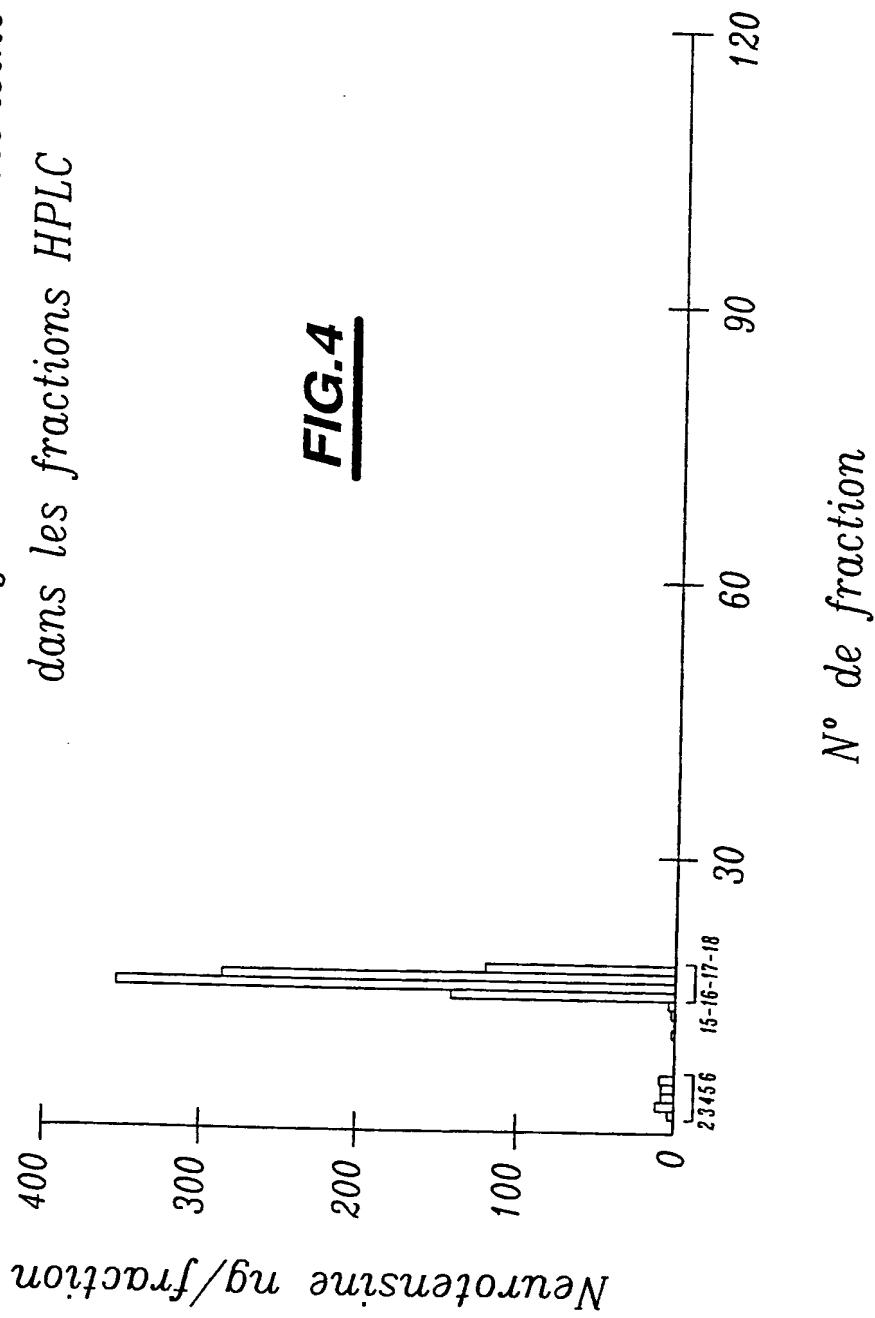
FIG.3

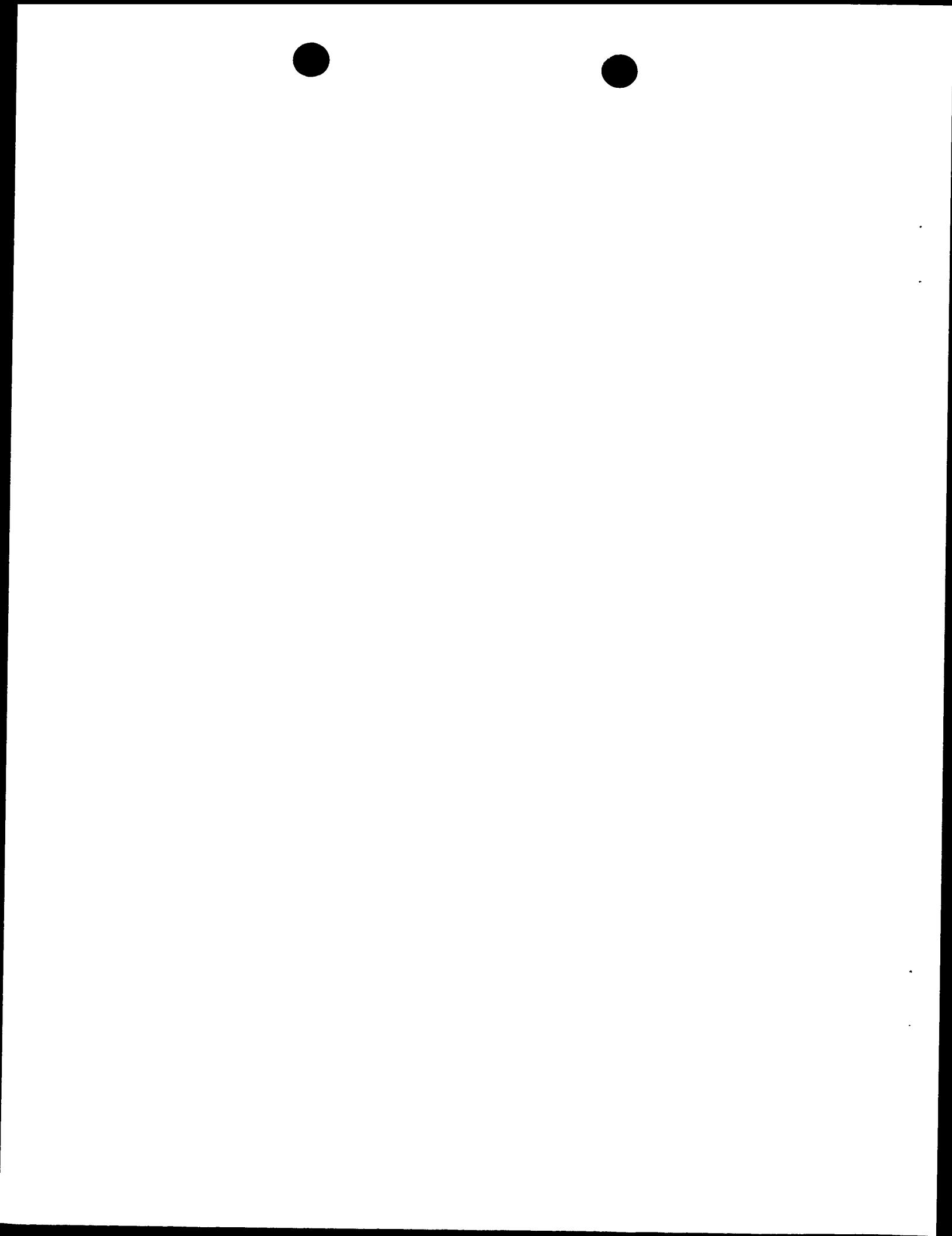


4/4

Dosage RIA de la neurotensine
dans les fractions HPLC

FIG.4





LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANTS:

- (A) NOM: INSERM
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: Paris
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75013
- (G) TELEPHONE: 0144236000
- (H) TELECOPIE: 0145856856

- (A) NOM: UNIVERSITE McGill
- (B) RUE: 3550, rue University
- (C) VILLE: Montréal
- (E) PAYS: QUEBEC
- (F) CODE POSTAL: H3A 2A7
- (G) TELEPHONE: (514)3984200
- (H) TELECOPIE: (514)3988479

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Procédé de criblage utile pour identifier des ligands potentiels pour un récepteur capable de s'internaliser.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de base
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: non pertinent

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

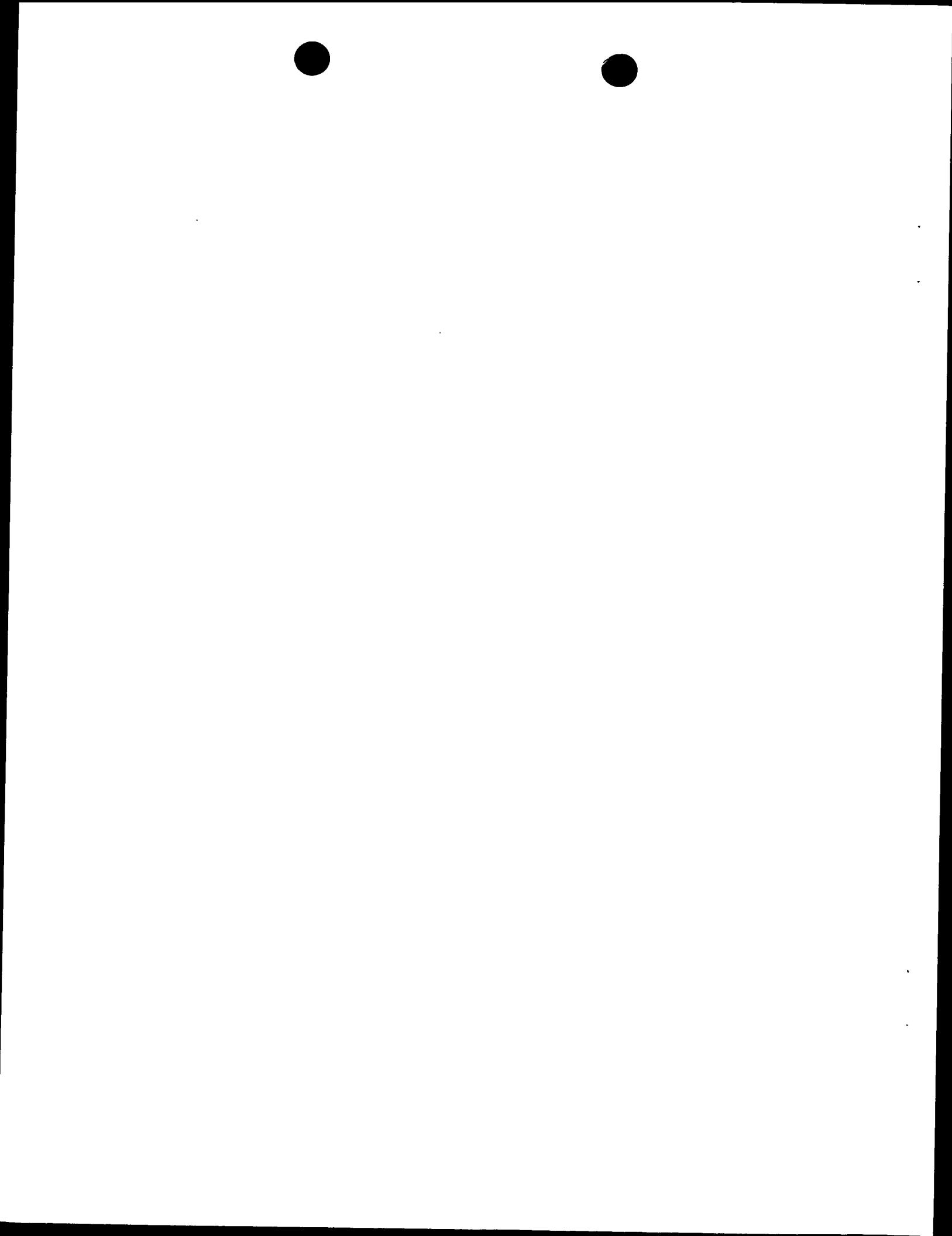
CTT AAG CTT ATG CAC CTC AAC AGC TCC GTG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de base
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple



(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

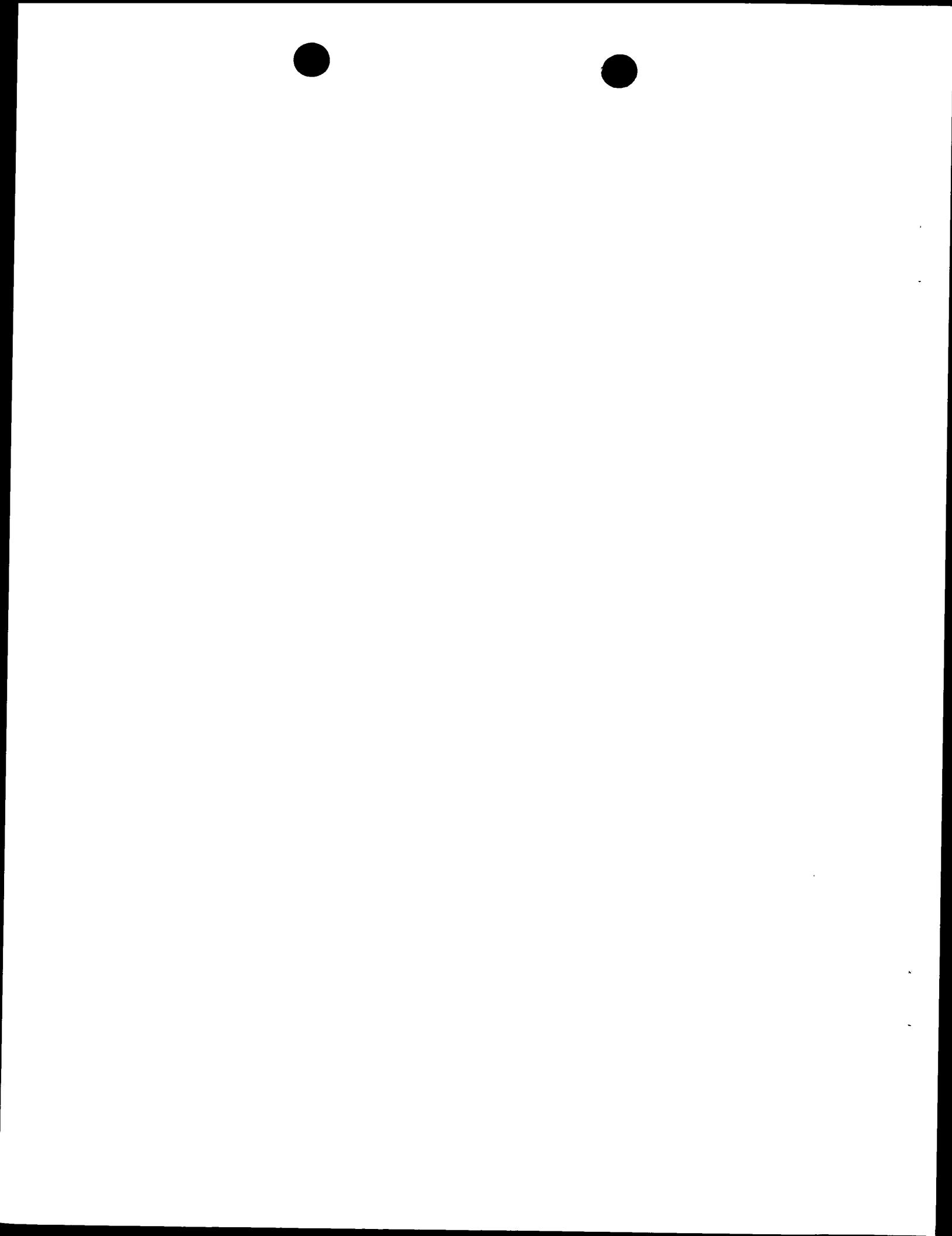
(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: non pertinent

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TTT GGA TCC GCG TAC AGG GTC TCC CGG GT

30



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/00113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/50 G01N33/58 G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 98 10287 A (UNIV PENNSYLVANIA) 12 March 1998 (1998-03-12) claim 2</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-4, 13, 14



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March 2000

Date of mailing of the international search report

20/04/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No
PCT/FR 00/00113

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	B R CONWAY, L K MINOR, J Z XU, J W GUNNET, R DEBIASIO, M R D'ANDREA, R RUBIN, R DEBIASIO, K GIULIANO, L ZHOU, K T DEMAREST: "Quantification of G-protein coupled receptor internalization using G-protein coupled receptor-green fluorescent protein conjugates with the ArrayScan high-content screening system" JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, vol. 4, no. 2, 1999, pages 75-86, XP002120083 abstract; figure 5 & "Fourth Annual Conference and Exhibition of The Society for Biomolecular Screening" 22 September 1998 (1998-09-22)	1-14
O, X	WO 97 20931 A (US HEALTH ;HTUN HAN (US); HAGER GORDON L (US)) 12 June 1997 (1997-06-12) claims 1,5,16	1-15
X	WO 98 38490 A (BIODX INC ;DUNLAY R TERRY (US); GOUGH ALBERT H (US); GIULIANO KENN) 3 September 1998 (1998-09-03) example 5	1,2,4-7, 10,11,14
X	WO 00 03246 A (CELLOMICS INC ;DUNLAY TERRY (US); GIULIANO KEN A (US); GOUGH ALBER) 20 January 2000 (2000-01-20) the whole document	1-14
A	US 5 760 188 A (BEAUDET ALAIN ET AL) 2 June 1998 (1998-06-02) column 6, line 39 - line 54	1-14
A	FERGUSON S G ET AL: "Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization" LIFE SCIENCES, vol. 17/18, no. 62, 27 March 1998 (1998-03-27), page 1561 1565 XP002076355 ISSN: 0024-3205 abstract	1-14
A	T-T YANG, L CHENG, S R KAIN: "Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 24, no. 22, 1996, pages 4592-4593, XP002120084 cited in the application the whole document	1-4
	---	-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/00113

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M ORMÖ, A B CUBITT, K KALLIO, L A GROSS, R Y TSIEN, S J REMINGTON: "Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein" SCIENCE, vol. 273, 6 September 1996 (1996-09-06), XP002120085 cited in the application the whole document -----	1,5-7
A	WO 91 06011 A (UNIV LEHIGH) 2 May 1991 (1991-05-02) claim 1 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR00/00113**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **15**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See supplementary sheet pct/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

Claim No.: 15

Claim 15 of the present application concerns a compound defined by reference to a desired property, namely its capacity to be bound to a receptor of interest.

There is no mention of any technical characteristic in Claim 15 which could lead to such a desired property. A support basis as defined by PCT Article 6 and/or a disclosure as defined by PCT Article 5 can be found for only a very restricted number of compounds which could fall within the scope for which protection is being sought. A partial support basis exists for Claim 15 inasmuch as a neurotensin receptor marked with the fluorescent EGFP protein is internalised in the presence of a neurotensin as ligand (Example 1) as well as in the presence of pre-purified fractions of an extract of frog brains (Example 2). However, Claim 15 does not provide any means to distinguish substances forming part of prior art, for example neurotensin which is already known, from novel substances. Therefore, it is not possible to deduce either from Claim 5 (PCT Article 6) or from the description (PCT Article 5) any definition of the subject matter for which protection could be legitimately sought.

Notwithstanding the reasons stated above, the claims are also lacking in clarity (PCT Article 6). Indeed, there has been an attempt to define the compound or the substance by means of the result to be achieved. In the present case likewise, the lack of clarity is such that it is not possible to carry out a significant search covering the whole scope covered by the claims.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1 (e)). The applicant is warned that the guideline adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter unless a search has been carried out thereon. This position will remain unchanged, notwithstanding that the claims have or have not been modified, either after receiving the search report, or during any procedure under Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/00113

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9810287	A	12-03-1998	US	5776700 A	07-07-1998
WO 9720931	A	12-06-1997	AU CA	1283497 A 2239951 A	27-06-1997 12-06-1997
WO 9838490	A	03-09-1998	US AU EP AU EP	5989835 A 6667898 A 0983498 A 3297197 A 0912892 A	23-11-1999 18-09-1998 08-03-2000 05-01-1998 06-05-1999
WO 0003246	A	20-01-2000		NONE	
US 5760188	A	02-06-1998	AU WO	6352296 A 9704311 A	18-02-1997 06-02-1997
WO 9106011	A	02-05-1991	US AU EP JP	5135848 A 6641690 A 0497881 A 5504196 T	04-08-1992 16-05-1991 12-08-1992 01-07-1993

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. de Internationale No

PCT/FR 00/00113

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/50 G01N33/58 G01N33/566

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 10287 A (UNIV PENNSYLVANIA) 12 mars 1998 (1998-03-12) revendication 2 ----	1-4, 13, 14 -/-



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20/04/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hart-Davis, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. Internationale No
PCT/FR 00/00113

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	B R CONWAY, L K MINOR, J Z XU, J W GUNNET, R DEBIASIO, M R D'ANDREA, R RUBIN, R DEBIASIO, K GIULIANO, L ZHOU, K T DEMAREST: "Quantification of G-protein coupled receptor internalization using G-protein coupled receptor-green fluorescent protein conjugates with the ArrayScan high-content screening system" JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, vol. 4, no. 2, 1999, pages 75-86, XP002120083 abrégé; figure 5 & "Fourth Annual Conference and Exhibition of The Society for Biomolecular Screening" 22 septembre 1998 (1998-09-22)	1-14
0, X	---	1-15
X	WO 97 20931 A (US HEALTH ;HTUN HAN (US); HAGER GORDON L (US)) 12 juin 1997 (1997-06-12) revendications 1,5,16	1,2,4-7, 10,11,14
X	WO 98 38490 A (BIODX INC ;DUNLAY R TERRY (US); GOUGH ALBERT H (US); GIULIANO KENN) 3 septembre 1998 (1998-09-03) exemple 5	1-14
E	WO 00 03246 A (CELLOMICS INC ;DUNLAY TERRY (US); GIULIANO KEN A (US); GOUGH ALBER) 20 janvier 2000 (2000-01-20) le document en entier	1-14
A	US 5 760 188 A (BEAUDET ALAIN ET AL) 2 juin 1998 (1998-06-02) colonne 6, ligne 39 - ligne 54	1-14
A	FERGUSON S G ET AL: "Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization" LIFE SCIENCES, vol. 17/18, no. 62, 27 mars 1998 (1998-03-27), page 1561 1565 XP002076355 ISSN: 0024-3205 abrégé	1-14
A	T-T YANG, L CHENG, S R KAIN: "Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 24, no. 22, 1996, pages 4592-4593, XP002120084 cité dans la demande le document en entier	1-4

-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. No Internationale No
PCT/FR 00/00113

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	M ORMÖ, A B CUBITT, K KALLIO, L A GROSS, R Y TSIEN, S J REMINGTON: "Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein" SCIENCE, vol. 273, 6 septembre 1996 (1996-09-06), XP002120085 cité dans la demande le document en entier ---	1,5-7
A	WO 91 06011 A (UNIV LEHIGH) 2 mai 1991 (1991-05-02) revendication 1 ---	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 00/00113

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°^o se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. Les revendications n°^o 15 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210

3. Les revendications n°^o sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^o

4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^o

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.

Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/SA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 15

La revendication 15 présente a trait à un composé défini en faisant référence à une propriété souhaitable, à savoir sa capacité de se lier à un récepteur d'intérêt.

Aucune caractéristique technique n'est présente dans la revendication 15 qui conduira à une telle propriété souhaitable. Un fondement au sens de L'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT ne peut être trouvé que pour un nombre très restreint des composés qui ferait partie du domaine pour lequel la protection est recherchée. Un fondement partiel existe pour la revendication 15 dans la mesure où un récepteur de la neurotensine marqué avec la protéine fluorescente EGFP s'internalise en présence de la neurotensine comme ligand (Exemple 1) ainsi qu'en présence de fractions prépurifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille (Exemple 2). Cependant la revendication 15 ne fournit aucun moyen de distinguer des substances faisant partie de l'état de la technique, par exemple la neurotensine déjà connue, des substances nouvelles. Aucune définition de la matière pour laquelle une protection pourrait être légitimement revendiquée ne peut donc être déduite de la revendication 15 (Article 6 PCT) ou de la description (Article 5 PCT).

Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté (Article 6 PCT). En effet, on a cherché à définir le composé ou la substance au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den. .e Internationale No

PCT/FR 00/00113

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 9810287 A	12-03-1998	US	5776700 A		07-07-1998
WO 9720931 A	12-06-1997	AU CA	1283497 A 2239951 A		27-06-1997 12-06-1997
WO 9838490 A	03-09-1998	US AU EP AU EP	5989835 A 6667898 A 0983498 A 3297197 A 0912892 A		23-11-1999 18-09-1998 08-03-2000 05-01-1998 06-05-1999
WO 0003246 A	20-01-2000	AUCUN			
US 5760188 A	02-06-1998	AU WO	6352296 A 9704311 A		18-02-1997 06-02-1997
WO 9106011 A	02-05-1991	US AU EP JP	5135848 A 6641690 A 0497881 A 5504196 T		04-08-1992 16-05-1991 12-08-1992 01-07-1993